

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Patent Application of)

Yoshikatsu KODAMA et al.)

Application No.: 09/903,734)

Filed: July 13, 2001)

For: PHARMACEUTICAL COMPOSITION)
USEFUL IN THE PREVENTION OR)
TREATMENT OF PEPTIC ULCERS)

) Group Art Unit: Unassigned

) Examiner: Unassigned



CLAIM FOR CONVENTION PRIORITY

Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

Sir:

The benefit of the filing date of the following prior foreign application in the following foreign country is hereby requested, and the right of priority provided in 35 U.S.C. § 119 is hereby claimed:

Japanese Patent Application No. 2000-214835

Filed: July 14, 2000

In support of this claim, enclosed is a certified copy of said prior foreign application. Said prior foreign application was referred to in the oath or declaration. Acknowledgment of receipt of the certified copy is requested.

Respectfully submitted,

BURNS, DOANE, SWECKER & MATHIS, L.L.P.

Date: October 29, 2001

By: Susan M. Dadio
Susan M. Dadio
Registration No. 40,373

P.O. Box 1404
Alexandria, Virginia 22313-1404
(703) 836-6620

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日
Date of Application:

2000年 7月14日

出願番号
Application Number:

特願2000-214835

出願人
Applicant(s):

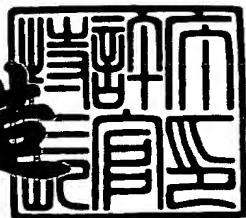
株式会社ゲン・コーポレーション
株式会社日清製粉グループ本社



2001年 7月 6日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2001-3063770

【書類名】 特許願
【整理番号】 G1X64P
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 A61K 39/46
【発明者】
【住所又は居所】 岐阜県岐阜市佐野839番地の1 株式会社ゲン・コーポレーション免疫研究所内
【氏名】 児玉 義勝
【発明者】
【住所又は居所】 埼玉県入間郡大井町鶴ヶ岡5丁目3番1号 日清製粉株式会社 ファインケミカル研究所内
【氏名】 木村 修武
【特許出願人】
【識別番号】 000129976
【住所又は居所】 岐阜県岐阜市折立296番地1
【氏名又は名称】 株式会社ゲン・コーポレーション
【特許出願人】
【識別番号】 000226998
【住所又は居所】 東京都千代田区神田錦町一丁目25番地
【氏名又は名称】 日清製粉株式会社
【代理人】
【識別番号】 100081352
【住所又は居所】 東京都中央区日本橋本町4丁目4番2号東山ビル 広瀬
内外特許事務所
【弁理士】
【氏名又は名称】 広瀬 章一
【手数料の表示】
【予納台帳番号】 000365
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9206480

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 消化性潰瘍の予防剤および治療剤

【特許請求の範囲】

【請求項1】 (1) ヘリコバクター・ピロリのウレアーゼを抗原として免疫した鶏が産生した卵から得た、前記抗原に特異的な抗体および、(2) 胃酸分泌抑制剤からなるヘリコバクター・ピロリ定着阻害剤。

【請求項2】 (1) ヘリコバクター・ピロリのウレアーゼを抗原として免疫した鶏が産生した卵から得た、前記抗原に特異的な抗体および、(2) 胃酸分泌抑制剤を有効成分として含有する消化性潰瘍の予防剤および治療剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ヘリコバクター・ピロリ定着阻害剤、およびヘリコバクター・ピロリの感染によって引き起こされる消化性潰瘍を効果的に予防または治療しうる経口予防剤、治療剤に関する。

【0002】

【従来の技術】

現在、消化性潰瘍の根治的治療にはヘリコバクター・ピロリの除菌が不可欠であると考えられており、その除菌療法としては以下に説明するように抗生物質と胃酸分泌抑制剤との併用療法が広く提唱されている。

【0003】

ヘリコバクター・ピロリ (Helicobacter pylori) (以下、H pと略称することがある) は、一端に数本の鞭毛 (flagella) を持つ、らせん型をしたグラム陰性桿菌で、ヒトの胃粘膜に生息する菌である。この菌は、1983年オーストラリアのMarshall, B. J. とWarren, J. R. によって胃炎、胃潰瘍患者の胃生検材料から高率に検出されることが報告された。

【0004】

以来、疫学的研究から、この菌は胃炎、胃潰瘍、十二指腸潰瘍の起因菌であり、さらには胃癌などの疾患と関連があるとの報告が相次いで発表されている。H

H p が一旦胃粘膜に定着すると、感染に対する免疫応答が強い（抗体価が高い）にもかかわらず、除菌されず胃内に生息し続ける。そのため、抗生物質による治療によって完全に除菌できない限り、投薬を中止すると約1カ月以内に治療前の感染状態に戻ってしまう。しかも胃内は酸度の高い塩酸によってpHが非常に低く保たれているので、多くの抗生物質は不活性化される。このような理由で、*H p* の除菌には、胃酸分泌を強力に抑制するプロトンポンプインヒビターと除菌薬（抗生物質）が併用の形で使用されている。しかし、このような抗生物質の長期投与は、その副作用に加え、耐性菌の増加という非常に重大な問題が危惧される。

【0005】

除菌を目的とした抗生物質の投与による副作用および耐性菌の増加などの問題を解決する方法として、経口ワクチンによる免疫療法のアプローチが見られるが、実用には至っていない。また、経口ワクチンではヒトへの応用に際してアジュvantの安全性の問題がある。しかもワクチンはあくまで予防を主体とするものであり、一旦*H p* が感染した患者に対しては効果は望めない。

【0006】

そこで、ワクチンに代わる免疫療法として、相場等（第30回日本無菌生物ノートバイオロジー学会総会、日程と抄録第22頁、要望演題18 *Helicobacter pylori* 制御の新しい試み、1997年1月）、特開平4-275232号公報、および日本農芸化学会誌、講演要旨集、71、52頁、20p22（1997）に*H p* 全菌体を抗原として得られた鶏卵抗体の使用が提案されているが、全菌体に対する抗体では完全に除菌することができず、有効な消化性潰瘍の予防剤、治療剤を提供するものではない。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、抗生物質の使用に伴う副作用や耐性菌増加という欠点を持たず、ヘリコバクター・ピロリ感染によって引き起こされる消化性潰瘍に対して効果的で安全性の高い予防剤および治療剤を提供することである。

【0008】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、強酸性の胃内での*H p* 増殖の鍵となる胃粘膜への定着に関して

知見を得て、先に、H p の胃粘膜への定着を完全に阻止するための特異的鶏卵抗体を提供した（特開平10-2287585号）。すなわち、それまで定着因子とは考えられていなかったウレアーゼについて、これがH p の胃粘膜への定着に関与するとの知見を得てH p のウレアーゼに対する鶏卵抗体がH p の胃粘膜への定着阻害に有効であることを実証した。

【0009】

本発明は、上記発明をさらに発展させたものであり、抗ウレアーゼ抗体に胃酸分泌抑制剤を併用すると一層効果的であり、特異的抗体の投与量を減らしても胃内よりH p を完全に除菌しうることを見出したことに基づいてなされた。

【0010】

すなわち、本発明の要旨は、(1) ヘリコバクター・ピロリのウレアーゼを抗原として免疫した鶏が産生した卵から得た、前記抗原に特異的な抗体および、(2) 胃酸分泌抑制剤からなるヘリコバクター・ピロリ定着阻害剤にある。

【0011】

さらに、本発明は(1) ヘリコバクター・ピロリのウレアーゼを抗原として免疫した鶏が産生した卵から得た、前記抗原に特異的な抗体および、(2) 胃酸分泌抑制剤を有効成分として含有する消化性潰瘍の予防剤および治療剤にも関する。

【0012】

【発明の実施の形態】

以下に本発明を詳細に説明する。

本発明の抗体含有組成物を得るには、まず、産卵鶏に免疫するための抗原としてH p のウレアーゼを調製する。抗原の調製に用いるH p の菌株としては例えば#130(Cag A+) (Vac A+)、NSP#305(Cag A+) (Vac A+)、NSP#335(Cag A+) (Vac A+)、NSP#355(Cag A-) (Vac A-) 等のヒト臨床分離株が挙げられる。これらの菌株を培養後、硫酸化セルロファインゲルを用いたアフィニティカラムクロマトグラフイー (J.Biol.Chem., 273:18130-18138, 1998)などの手段によりウレアーゼ抗原を調製する。

【0013】

また、抗原として用いるウレアーゼとしては、組換え型ウレアーゼを利用する

こともできる。組換え型ウレアーゼの調製は常法により行えばよく、例えば以下のようにして行うことができる。H p のゲノムDNA を抽出し、ウレアーゼ分子をコードする遺伝子を PCR法により増幅し、これを大腸菌用の発現ベクター (pKK2 33-2等) に既知の方法で組み込む。このベクターを適応する宿主、大腸菌(XLI-B lue 等) に導入し、組換え体を得る。この組換え体を培養し、発現したウレアーゼを回収して組換え型ウレアーゼを調製できる。また、酵母、哺乳動物細胞または昆虫細胞等を用いた発現系を利用して組換え型ウレアーゼを調製してもよい。組換え型ウレアーゼの調製方法は、例えば、Molecular Cloning. A Laboratory Manual (2nd ed.) (Cold Spring Harbor Press)、DNA Cloning 2 (2 nd ed.) (IRL Press)等に詳しく記載されている。

【0014】

産卵鶏への免疫は、各抗原を所望により免疫増強剤（アジュバント）と共に鶏に接種することにより行う。この接種は皮下注射、筋肉注射などの方法が可能である。抗原の接種量は、使用抗原の種類および免疫増強剤の種類に応じて、目的とする特異的抗体が体内に適当量形成され、しかも鶏に対して過度の毒性が発揮されないように決定する。通常は、抗原の投与から数週間以内に鶏の体内に投与した抗原に特異的な抗体が形成され、その鶏が産生する卵、特に卵黄にこの抗体が含まれるようになる。なお、抗原の接種は数回に分けて行うことができ、また高力価が持続するように追加接種することもできる。

【0015】

鶏卵中の抗体価は、既知の測定方法、例えばELISA を用いる方法により測定できる。

これらの方針によって鶏卵中に抗体が適当量生成したことが確認できた後、鶏卵を採取し、目的とする特異的抗体を回収する。本発明の抗体含有組成物としては、全卵もしくは卵黄をそのまま用いてもよいし、また全卵もしくは卵黄からスプレードライ法や凍結乾燥法などにより粉末化したものでもよい。あるいは、卵黄からヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート、ポリエチレングリコールなどを用いる方法により卵黄脂質成分を除去した後粉末化したもの、さらに硫酸アンモニウム塩析、硫酸ナトリウム塩析、低温エタノール沈殿法等の既知の蛋

白質精製法により精製したものなど、種々の形態のものを目的に応じて使用することができる。

【0016】

特異的鶏卵抗体と併用する胃酸分泌抑制剤としては、ファモチジン、ニザチジン、ロキサチジン、ラニチジン、シメチジン等のH₂ブロッカーや、オメプラゾール、ランソプラゾール、ラベプラゾールナトリウムなどのプロトンポンプインヒビターがあげられる。

【0017】

特異的抗体および胃酸分泌抑制剤からなるH_p定着阻害剤は、H_p感染モデル動物において、胃粘膜に付着しているH_pを完全に除菌することができる。この効果は、特異的鶏卵抗体の投与量が少ない場合においても発揮される。例えば、実験例2に示すように、特異的鶏卵抗体単独では除菌率90%である投与量（餌中の抗ウレアーゼ鶏卵抗体含有率0.0025%）においても胃酸分泌抑制剤との併用により除菌率100%とすることができる。除菌率90%では、薬剤の投与を中止するとH_pの再定着により投与前の感染状態に戻るため、潰瘍の治療剤としては除菌率100%のものが望ましい。抗体単独の投与で除菌率100%とするには抗体含有率を0.25%程度にすることが必要であるので、胃酸分泌抑制剤と併用した場合には1/100の抗体含有量（0.0025%）で有効となる。このように、本発明によればH_pを胃粘膜から完全に除菌するのに抗体の投与量を大幅に減らすことができる。また、胃酸分泌抑制剤のみの投与では胃内pHは5.0～7.0になるが、胃内におけるH_pの定着菌数を減少させる効果はない。

【0018】

また、従来行われてきた抗生物質と胃酸分泌抑制剤との併用では、胃酸分泌抑制剤は、抗生物質の塩酸による劣化を防止し、抗生物質は直接H_pに作用すると説明されている。本発明で用いる抗体は抗生物質とは作用メカニズムが異なり、抗体がH_pの接着因子であるウレアーゼと結合し、抗原（ウレアーゼ）抗体結合物からなる巨大な凝集塊が架橋状に作られ、結果的にH_pは定着力を失い、感染は成立しなくなるというものである。この過程が胃酸分泌抑制剤との併用により促進されると考えられる。

【0019】

本発明の、H_pウレアーゼに対する特異的鶏卵抗体と胃酸分泌抑制剤からなるH_p定着阻害剤は、安全で有効であり、しかも安価な消化性潰瘍の予防剤または治療剤として用いることができる。

【0020】

本発明のH_p定着阻害剤を消化性潰瘍の予防剤や治療剤として用いる場合、通常の製剤化方法により、本発明の定着阻害剤をそのままあるいは慣用の添加剤と共に、錠剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤、液剤などの経口用製剤とすることができる。添加剤には、例えば賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、抗酸化剤、着色剤、矯味剤などがあり、必要に応じて使用する。

【0021】

賦形剤としては、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、寒天、軽質無水ケイ酸、ゼラチン、結晶セルロース、ソルビトール、タルク、デキストリン、デンプン、乳糖、白糖、ブドウ糖、マンニトール、メタ珪酸アルミン酸マグネシウム、リン酸水素カルシウム等が使用できる。

【0022】

結合剤としては、例えば、アラビアゴム、アルギン酸ナトリウム、エタノール、エチルセルロース、カゼインナトリウム、カルボキシメチルセルロースナトリウム、寒天、精製水、ゼラチン、デンプン、トラガント、乳糖、ヒドロキシセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルピロリドン等が挙げられる。

【0023】

崩壊剤としては、例えば、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、カルボキシメチルセルロースカルシウム、結晶セルロース、デンプン、ヒドロキシプロピルスターーチ等が挙げられる。

【0024】

滑沢剤としては、例えば、ステアリン酸、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、タルク、硬化油、ショ糖脂肪酸エステル、ロウ類等が挙げられる。

【0025】

抗酸化剤としては、トコフェロール、没食子酸エステル、ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）、ブチルヒドロキシアニソール（BHA）、アスコルビン酸等が挙げられる。

【0026】

さらに、必要に応じてその他の添加剤や薬剤、例えば制酸剤（炭酸水素ナトリウム、炭酸マグネシウム、沈降炭酸カルシウム、合成ヒドロタルサイト等）、胃粘膜保護剤（合成ケイ酸アルミニウム、スクラルファート、銅クロロフィリンナトリウム等）や消化酵素（ビオジアスター、リパーゼ等）を加えてもよい。

【0027】

消化性潰瘍の予防剤または治療剤の投与は経口により行い、特異的抗体の投与量は成人1日当たり精製した鶏卵抗体として、通常0.5～20mg、好ましくは2～15mgであり、胃酸分泌抑制剤の投与量は成人1日当たり20～30mgが好ましい。

【0028】

次に、本発明を実施例によってさらに詳細に説明するが、本発明はそれらによって制限されるものではない

【0029】

【実施例】

【実施例1】

(1) ヘリコバクター・ピロリの組換え型ウレアーゼの調製

H_PのTU130 株のゲノムDNA を抽出し、ウレアーゼ分子をコードするDNA を PCR法により増幅した。増幅したウレアーゼ遺伝子を発現ベクターpKK233-2（アマシャム・ファルマシア・バイオテク社製）に組み込み、ウレアーゼ発現用ベクターを得た。このベクターを大腸菌XL1-Blueに取り込み、ウレアーゼ発現用大腸菌を得た。この大腸菌をアンピシリンを100 μg / mlの濃度で添加した1.0LのLB培地で37℃、100rpmで振盪培養し、菌が対数増殖期に入ったところで、発現を誘発するためにイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド(IPTG)を0.5mM の濃度で添加し、さらに同一条件で一晩振盪培養した。得られた培養液を 4,000×g で20分 (+4℃) 遠心し、大腸菌の菌体を得た。

【0030】

この菌体を、菌体破碎用トリス緩衝液 (50mM Tris-HCl(pH8.0), 100mM NaCl, 1mM EDTA) に懸濁した後、リゾチームを0.1mg/mlの濃度で添加し、氷中にて30分間放置した。次いで、懸濁液を-80°Cで1時間以上凍結した後、室温で融解させた。次いで、超音波で処理した後、TritonX-100 を1%の濃度で添加し、30,000×gで30分 (+4°C) 遠心し、組換え型ウレアーゼの封入体を得た。

【0031】

これらの封入体を、封入体洗浄用緩衝液 (0.1% SDS, 1.0% TritonX-100, 1.0% デオキシコール酸ナトリウムを含むトリス緩衝液 (50mM Tris-HCl(pH8.0), 150mM NaCl, 1mM EDTA)) に懸濁した後、30,000×gで20分 (+4°C) 遠心し、沈殿した封入体についてこの洗浄をさらに2回繰り返した。得られた封入体をPBSに希釈し、免疫用抗原とした。

【0032】

得られた組換え型ウレアーゼはウエスタン・ブロッティングにより、天然型ウレアーゼと同様の抗原性を示すものであることを確認した。

(2) 産卵鶏への免疫

免疫には12週齢前後の白色レグホン種、ハイラインアリア系群を用いた。上記(1)で得られた免疫用抗原 (蛋白量を5mg/mlに調整) を油性アジュバントと混和した後、左右の胸筋内に0.5 mlずつ注射した (初回免疫)。その6週後にブスターとして同量の抗原を免疫し、卵黄中の抗体価が有意に上昇して安定した。ブスター注射2週後から集卵を開始し、4週間卵を集めた。なお、卵黄中の抗体価は4~6ヶ月間安定していた。その後、抗体価が低下したので、同様の方法で再注射したところ、元の抗体価のレベルまで回復した。

【0033】

(3) 鶏卵卵黄中の抗体価の測定

免疫卵を割卵して卵黄を取り出した後、重量を計り、これに等量のPBSを加えて卵黄成分をよく溶解し、この混合物に対して等量のクロロホルムを加え、激しく振とう攪拌し、37°Cで15分静置した後遠心して上清を得た。この上清を抗体価測定用試料とした。抗体価の測定はELISAによって行った。方法は以下に示した

通りであるが、固相化抗原並びにホースラディッシュペルオキシダーゼー抗ニワトリ IgG コンジュゲートはチエッカーボードタイトレーションを行うことにより、至適濃度を設定した。プレートは96ウエルプレートを用い、固相化には Hp 天然型ウレアーゼおよび全菌体可溶化抗原を用いた。抗原は蛋白量が 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように炭酸緩衝液(pH9.6)で希釈し、1 ウエル当たり 100 μl ずつ加え、+4°C で一晩静置した。使用時には PBS-Tween20 で各ウエルを 3 回洗浄した後、プロッキングのため 3% BSA 溶液を 150 μl ずつ加え、37°C で 60 分静置した。次に、各ウエルを PBS-Tween20 で 3 回洗浄した後、各試料をウエル当たり 100 μl ずつ加え、37°C で 60 分反応させた。反応後、再び PBS-Tween20 で洗浄し、12,000 倍に希釈したコンジュゲートを 100 $\mu\text{l}/\text{ウエル}$ で加え、再び 37°C で 60 分反応させた。ウエルを 5 回洗浄した後、基質（過酸化水素水を含む O-フェニレンジアミン 2 塩酸）を加えて室温で発色させ、20 分後に 50 $\mu\text{l}/\text{ウエル}$ の 3N 硫酸を添加して反応を停止させた。その後、各ウエルの吸光度(490nm)を ELISA オートリーダーで測定した。なお、ランニングプレートには 2 倍段階希釈した抗体価が既知の抗ウレアーゼ鶏卵卵黄抗体を置いて、その検定曲線からサンプルの抗体価を測定した。

【0034】

(4) 鶏卵卵黄抗体の調製

免疫卵を水洗、消毒後、割卵機にて卵黄を分離し、8 kg ずつ小分けして使用時まで -20°C 以下に保存した。精製は以下に示した方法により実施した。すなわち、卵黄 7.5 kg を出発材料とし、卵黄重量に対し 10 倍量の精製水を加えて脱脂した。上清に 40% 飽和になるように硫酸アンモニウムを加えて攪拌し、遠心によりペレットを得た。ペレットを生理的食塩水で溶かし、再び 30% 飽和塩析を行いペレットを得た。このペレットを少量の生理的食塩水で溶解し、これに最終濃度が 50% になるように攪拌しながら、-20°C に冷却したエタノールを徐々に加えた。遠心後、ペレットを生理的食塩水で溶かし凍結乾燥した。その結果、淡黄白色の粉末が約 11 g 得られた。抗体の回収率は 47% 前後、IgG 純度は 95% 以上、水分含量は 2% 以下であった。

【0035】

〔実験例 1〕 インビトロ実験

上記実施例1の(4)で製造した抗ウレアーゼ鶏卵卵黄抗体を用いて、H_pが產生するウレアーゼの胃粘膜への定着阻害効果をインビトロ実験系において検討した。

【0036】

(実験材料および方法)

本発明者等は、先に、H_pの接着因子がH_pが產生するウレアーゼであることを見出しており、このウレアーゼは胃粘膜のムチンに結合するので、ウレアーゼ接着抑制試験に用いる豚胃ムチンを以下のようにして調製した。

【0037】

豚胃ムチンの調製

約2ヶ月齢の健康な豚を屠殺し、胃部を摘出し、内部に0.1Mリン酸緩衝液(pH7.4)(0.15M NaCl、5mM N-エチルマレイミド(NEM)、1mM フェニルメチルスルホニルフルオライド(PMSF)、1mM EDTA含有)を加えて洗浄した。胃を切開し、粘膜を削り取り、上記の緩衝液に浮遊させた。この粘膜浮遊液を氷冷しながらポリトロンホモゲナイザーを用いて均一にした。これを15,000×gで遠心し上清を得た。この上清を25,000×gで再び遠心し、上清を回収し、蒸留水で透析した後、凍結乾燥して粗精製胃ムチンを得た。次いで、この乾燥粗精製胃ムチンをPBS(pH6.8)(6M塩酸グアニジンおよびプロテアーゼインヒビター(5mM NEM, 1mM PMSF, 1mM EDTAを含む)に溶解し、これを塩化セシウム密度勾配(1.5g/ml)に重層し、200,000×gで48時間遠心した。シアル酸含有分画の検出はニトロセルローズ膜プロッティングと過ヨウ素酸シフ試薬による染色によって行った。発色した分画をプールし、再び塩化セシウム密度勾配に重層して遠心した。染色陽性分画をプールし、凍結乾燥した。次いで、0.1Mリン酸緩衝液(0.1M NaCl含有、pH6.8)で平衡化したセファロースCL-4Bカラムを通してゲル濾過を行い、分画した。PAS染色陽性で、蛋白濃度の高い分画をプールし、PBS(pH6.8)で透析し、精製豚胃ムチンを得た。これを使用時まで-80°Cで保存した(精製豚胃ムチン)。なお、精製豚胃ムチンはSDS-PAGEの結果、66kDの糖タンパク質であることを認めた。

【0038】

ウレアーゼ接着抑制試験

ウレアーゼ接着試験用マイクロプレートは次のようにして作製した。96ウエルマイクロプレートの各々のウエルに天然型ウレアーゼ($5.0 \mu\text{g}/\text{ml}$)をウエル当たり $50 \mu\text{l}$ ずつ加え、4℃で一晩静置することによって固相化した。使用時には各々のウエルに3%BSAを加えて37℃で60分間反応させることによってブロッキングした後、接着培地(20mMリン酸緩衝液に0.05%ツイン20および0.15M NaClを含む)で3回洗浄したプレートをウレアーゼ接着抑制試験に供した。

【0039】

上記で作製したマイクロプレートを用いてウレアーゼ接着抑制試験を次のように行った。まず、種々の濃度に調整した試料とビオチン化豚胃ムチンとを混合し、ウレアーゼを固相化した96ウエルプレートのウエルに移し、37℃で60分間感作した。その後マイクロプレートのウエルを接着培地(pH4.0)で5回洗浄し、各々のウエルを65℃10分間加熱することによって固定した。固定した各々のウエルを接着培地(pH7.0)で1回洗浄し、ウレアーゼに接着したビオチン化豚胃ムチンを検出するため、各々のウエルにストレプトアビジンHRPを加え、室温で30分間反応させた。次いで、基質(過酸化水素水を含むオルトフェニレンジアミン2塩酸)を加え反応させた。反応停止液には3N硫酸を用いた。その後、各ウエルの吸光度(490nm)をELISAオートリーダーで測定した。なお、ランニングプレートには2倍段階希釈した既知量のビオチン化豚胃ムチンを置いて、その検定曲線から未知量のサンプルを測定した。

【0040】

(結果)

抗ウレアーゼ鶏卵卵黄抗体によるウレアーゼ接着阻止

図1に示したように、豚胃ムチンへのウレアーゼの接着は抗ウレアーゼ鶏卵卵黄抗体によって用量依存的に抑制された。ウレアーゼはH_p菌体表面に局在しているので、胃内において、この抗ウレアーゼ鶏卵卵黄抗体が菌体のウレアーゼに結合することによって接着因子であるウレアーゼがマスクされ感染阻止(除菌)が起こると考えられる。抗ウレアーゼ鶏卵卵黄抗体のウレアーゼ接着抑制率は抗体濃度 $2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ まではほぼ100%であるが、 $0.25 \mu\text{g}/\text{ml}$ で半減した。

【0041】

〔実験例2〕インビボ実験

実施例1で製造した抗ウレアーゼ鶏卵卵黄抗体と胃酸分泌抑制剤とを併用した場合のH_p除菌効果を動物実験により実証した。

【0042】

(方法)

実験動物としてH_p感染に対して最も高感受性を示すヘアレスマウス(NS: Hr/ICR系、財団法人動物繁殖研究所、受託番号 IAR-NHI-9701) (ATCC#72024)(Clin. Diagn. Lab. Immunol. 5: 578-582, 1998)を用いた。NSP335株(1×10^9 CFU/マウス)をマウスに経口接種して1週間飼育した後、抗ウレアーゼ鶏卵卵黄抗体を各種濃度で、さらにH₂ブロッカー(ファモチジン)またはプロトンポンプインヒビター(オメプラゾール)を1mg/マウス/日の濃度で混餌した餌を4週間投与した。試料を含まない対照群も設定し、供試マウス数は各群とも10匹とした。投与終了後2週間目に各群のマウスを屠殺し、胃を摘出し、内容物を除去した後、粘膜部分全体をホモゲナイザーで乳剤とし、H_p検出用材料とした。H_pの検出は乳剤をH_p検出用培地(ポアメディアH_p分離培地、栄研化学)に接種し、ガスパック法で37°C、5日間培養し、コロニー数を計測することによって行った。

【0043】

(結果)

H_p定着マウスにおける抗体と胃酸分泌抑制剤の併用による除菌効果

図2に示したように、H_p定着マウスにおいて抗ウレアーゼ鶏卵卵黄抗体は濃度依存的に胃内のH_pを除菌し、除菌率が100%となるのは餌中の抗体含有率が0.25%の場合であり、抗体含有率0.0025%では90%である。90%の除去率では消化性潰瘍の治療剤としては不完全であるが、胃酸分泌抑制剤を併用すると除去率は100%となる。すなわち、抗体のみの投与の場合に対し1/100の投与量で、H_p定着マウスにおいてH_pを胃内から完全に除去することができる。なお、対照群はH_pに100%(10/10)感染していた。

【0044】

以下に消化性潰瘍の治療剤の製造例を示す。使用する抗ウレアーゼ鶏卵抗体は実施例1において製造したものである。

〔製造例〕

処方例1（細粒剤）1.5kg 中

抗ウレアーゼ鶏卵抗体	10 g
ファモチジン	20 g
乳糖	1,100 g
トウモロコシデンプン	320 g
PVP(K-30)	50 g

上記成分をとり温式造粒法で造粒し、乾燥後、通常の方法により細粒を得た。

【0045】

処方例2（錠剤）

1. 抗ウレアーゼ鶏卵抗体	10 g
2. ファモチジン	30 g
3. 乳糖	400 g
4. トウモロコシデンプン	125 g
5. 結晶セルロース	210 g
6. PVP(K-300)	25 g
7. ステアリン酸マグネシウム	10 g

上記1～6の成分をとり、温式造粒法で顆粒を製造し、その後ステアリン酸マグネシウムを混ぜ、打錠末を得た。この粉末を用い、1錠270 mg重量の錠剤を製造した。

【0046】

処方例3（顆粒剤）1.5kg 中

抗ウレアーゼ鶏卵抗体	15 g
ファモチジン	30 g
乳糖(200M)	950 g
トウモロコシデンプン	450 g
PVP(K-30)	50 g

上記成分をとり押出造粒法で造粒し、乾燥後、通常の方法により顆粒剤を得た。

【0047】

【発明の効果】

以上より明らかのように、本発明によれば、抗ウレアーゼ鶏卵抗体と胃酸分泌抑制剤とを用いることにより、胃内のヘリコバクター・ピロリを完全に除菌することができ、しかも用いる抗体が少量でも効果的に除菌しうる。従って、ヘリコバクター・ピロリ感染によって引き起こされる消化性潰瘍に対して、安全で効果的、かつ安価な予防剤および治療剤を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

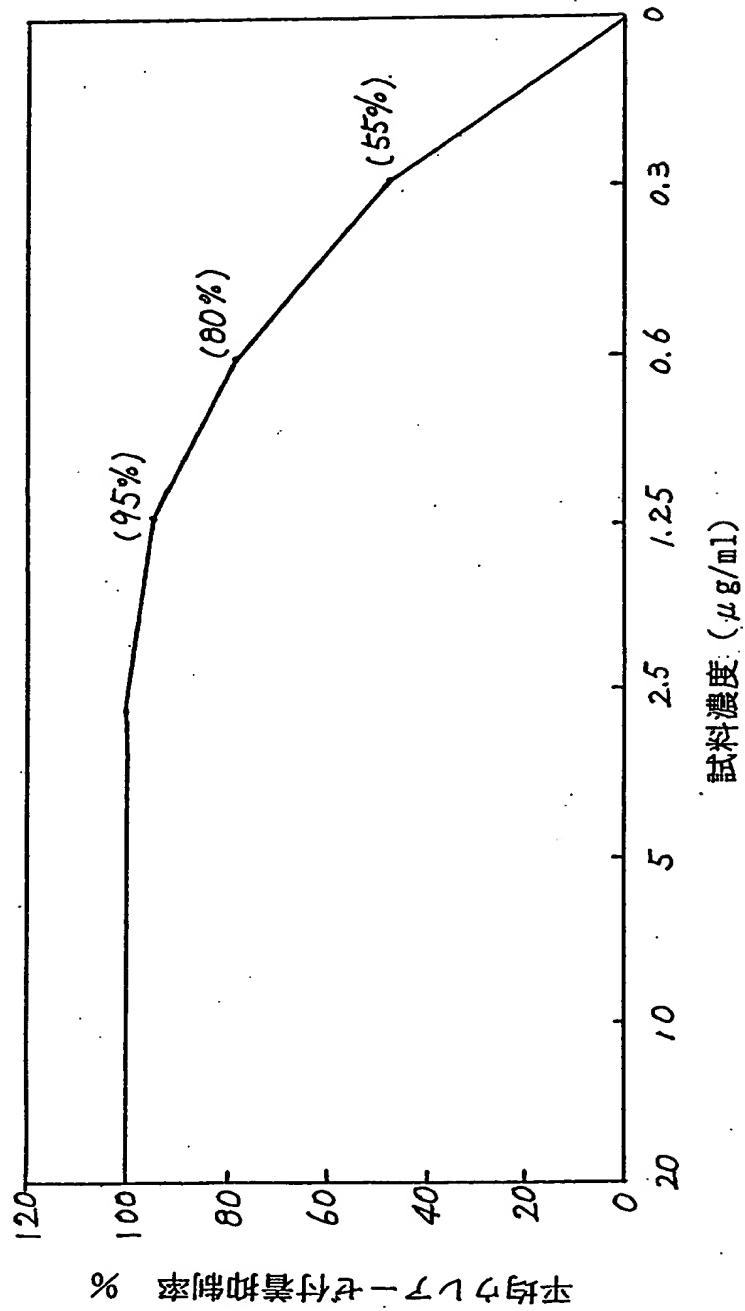
抗ウレアーゼ鶏卵抗体によるH p ウレアーゼの付着抑制率を示す図である。

【図2】

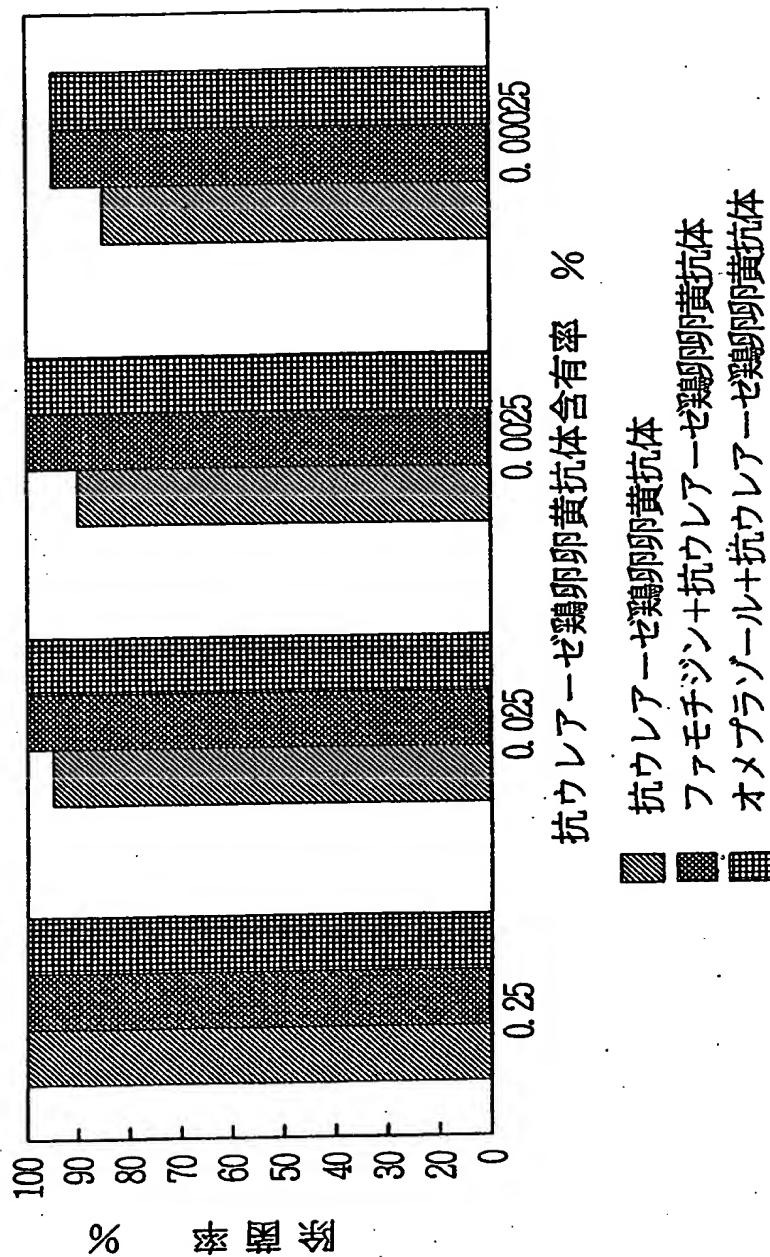
H p 定着マウスにおける除菌率を示す図である。

【書類名】 図面

【図1】



【図2】



【書類名】 要約書

【目的】 ヘリコバクター・ピロリ感染により生じる消化性潰瘍に対する有効で安全な予防剤、治療剤を提供する。

【構成】 (1) ヘリコバクター・ピロリのウレアーゼを抗原として鶏に免疫して得られた特異的鶏卵抗体および、(2) 胃酸分泌抑制剤からなるH p定着阻害剤。この阻害剤は胃からヘリコバクター・ピロリを完全に除菌することができ、消化性潰瘍に対する予防剤および治療剤として有用である。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2000-214835
受付番号	50000895350
書類名	特許願
担当官	松野 邦昭 2209
作成日	平成12年 7月18日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成12年 7月14日
【特許出願人】	
【識別番号】	000129976
【住所又は居所】	岐阜県岐阜市折立296番地1
【氏名又は名称】	株式会社ゲン・コーポレーション
【特許出願人】	
【識別番号】	000226998
【住所又は居所】	東京都千代田区神田錦町1丁目25番地
【氏名又は名称】	日清製粉株式会社
【代理人】	申請人
【識別番号】	100081352
【住所又は居所】	東京都中央区日本橋本町4丁目4番2号 東山ビル 広瀬内外特許事務所
【氏名又は名称】	広瀬 章一

次頁無

出願人履歴情報

識別番号 [000129976]

1. 変更年月日 1990年 8月 6日

[変更理由] 新規登録

住 所 岐阜県岐阜市折立296番地1

氏 名 株式会社ゲン・コーポレーション

出願人履歴情報

識別番号 [000226998]

1. 変更年月日 1998年 3月18日

[変更理由] 住所変更

住 所 東京都千代田区神田錦町1丁目25番地
氏 名 日清製粉株式会社

2. 変更年月日 2001年 7月 2日

[変更理由] 名称変更

住 所 東京都千代田区神田錦町1丁目25番地
氏 名 株式会社日清製粉グループ本社